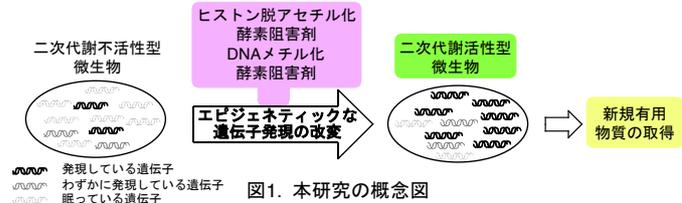


低分子阻害剤を用いたエピジェネティック制御に基づく
糸状菌由来新規二次代謝物の探索

東北大院薬¹、東北薬大² ○浅井禎吾¹、山本崇史¹、鐘ユーミン¹
森田峻太郎¹、羅丹¹、山下幸和²、大島吉輝¹

糸状菌は、ペニシリンなどの抗生物質やアフラトキシンのようなカビ毒など様々な生物活性物質を生産する重要な微生物資源として数多くの天然物探索研究が行われてきた。その結果、数多くの医薬品につながる有用物質が見いだされてきたが、最近では、新規物質取得の困難さが増してきている。しかし、ゲノム解読が進むにつれ、糸状菌には、これまで同定された化合物の数から予測されるより、遥かに多くの未同定二次代謝物生合成遺伝子が存在することが明らかになってきた。二次代謝は本来生育には必須ではないため、通常の液体培地中での純粋培養では、それらの遺伝子はほとんど発現していない可能性がある。すなわち、ゲノム上のこれら“眠る遺伝子”を活用することができれば、様々な新規天然物を創出できることが期待される。我々は、糸状菌に潜在する数多くの新規二次代謝物を取得するための方法論として、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構に着目した(図1)。



最近、ゲノム科学が進歩するなか、糸状菌においてもクロマチンの構造変化をともなうエピジェネティックな遺伝子発現制御が、二次代謝物の生産に大きな影響を及ぼすことが明らかになってきた^{1,2}。クロマチン構造には、ほどけた状態のユークロマチンと密に凝集したヘテロクロマチンの2つが存在し、ユークロマチン上に存在する遺伝子は活発に転写されており、一方、ヘテロクロマチン上の遺伝子の発現は抑制されていることが知られている。これらの構造変化は、DNA およびヒストンのアセチル化やメチル化等の化学修飾を介して誘導されることが明らかになってきた。例えば、ヒストンへのアセチル化は転写活性型クロマチン構造を、脱アセチル化は転写不活性型クロマチン構造をそれぞれ誘導することが知られている。また、DNAのメチル化は転写因子の接近を妨げ、直接遺伝子発現を抑制する(図2) ことに加え、転写不活性型ヘテロクロマチンの形成にも関連しており、遺伝子発現の抑制に重要な役割を果たしている。すなわち、遺伝子発現を抑制状態へと誘導することが知られているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) および DNA メチル化酵素 (DNMT) を阻害剤すれば、転写活性型クロマチン構造の割合が高まり、二次代謝物生合成遺伝子の発現も活性化されることが期待される(図2)。そこで、我々は、糸状菌培養液中に、HDAC や DNMT 阻害剤を添加することで、新規二次代謝物の取得を試みた。

最近、ゲノム科学が進歩するなか、糸状菌においてもクロマチンの構造変化をともなうエピジェネティックな遺伝子発現制御が、二次代謝物の生産に大きな影響を及ぼすことが明らかになってきた^{1,2}。クロマチン構造には、ほどけた状態のユークロマチンと密に凝集したヘテロクロマチンの2つが存在し、ユークロマチン上に存在する遺伝子は活発に転写されており、一方、ヘテロクロマチン上の遺伝子の発現は抑制されていることが知られている。これらの構造変化は、DNA およびヒストンのアセチル化やメチル化等の化学修飾を介して誘導されることが明らかになってきた。例えば、ヒストンへのアセチル化は転写活性型クロマチン構造を、脱アセチル化は転写不活性型クロマチン構造をそれぞれ誘導することが知られている。また、DNAのメチル化は転写因子の接近を妨げ、直接遺伝子発現を抑制する(図2) ことに加え、転写不活性型ヘテロクロマチンの形成にも関連しており、遺伝子発現の抑制に重要な役割を果たしている。すなわち、遺伝子発現を抑制状態へと誘導することが知られているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) および DNA メチル化酵素 (DNMT) を阻害剤すれば、転写活性型クロマチン構造の割合が高まり、二次代謝物生合成遺伝子の発現も活性化されることが期待される(図2)。そこで、我々は、糸状菌培養液中に、HDAC や DNMT 阻害剤を添加することで、新規二次代謝物の取得を試みた。

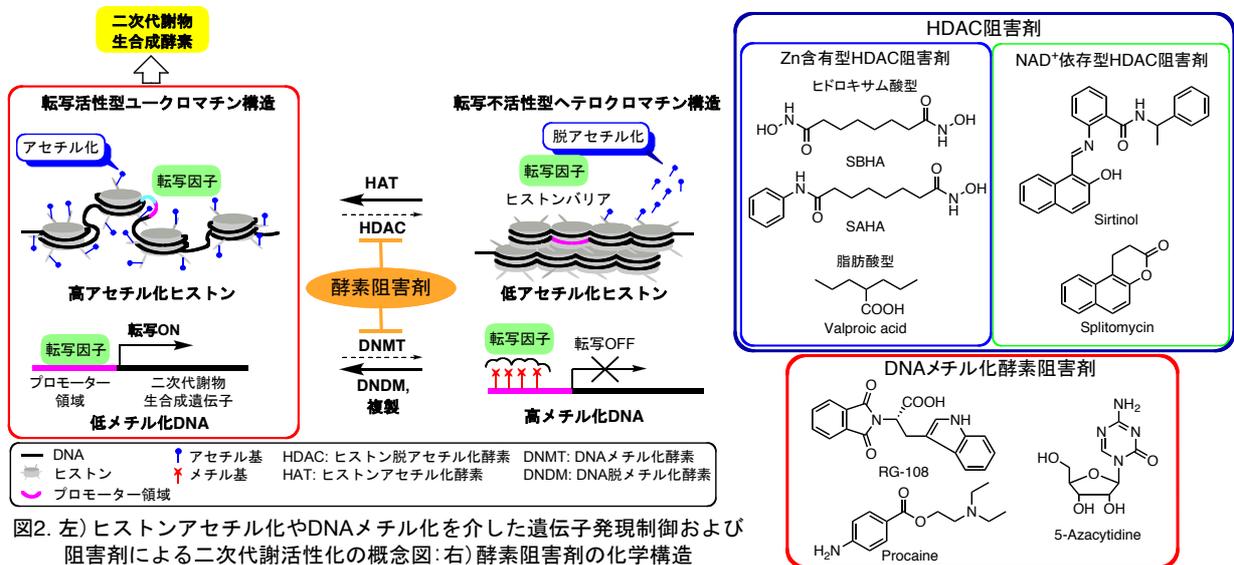


図2. 左) ヒストンアセチル化やDNAメチル化を介した遺伝子発現制御および阻害剤による二次代謝活性化の概念図: 右) 酵素阻害剤の化学構造

HDAC には、加水分解時に、 Zn^{2+} または NAD^+ を利用する 2 種類が存在する。 Zn^{2+} 型の阻害剤として、強い活性と低い選択制を持つヒドロキサム酸型の SBHA および SAHA、比較的選択制の高い脂肪酸型の valproic acid を、 NAD^+ 型の阻害剤として代表的な sirtinol および splitomycin をそれぞれ選択した。DNMT 阻害剤には、それぞれ阻害メカニズムの異なる RG-108、procaine および 5-azacytidine の 3 種を選択した (図 2)。糸状菌に関して、昆虫に寄生し、やがて死に至らしめるという特殊な生活環の中で、多くの生物活性物質を生産していると考えられる昆虫寄生糸状菌を用いた。昆虫寄生糸状菌を様々な阻害剤添加条件にて培養し、それぞれの培地および菌体の抽出物を逆相 HPLC にて分析し、含まれる二次代謝物の組成を比較した。中でも、*Cordyceps indigotica* (SBHA-1 mM)、*Torrubiella luteoestrata* (SBHA-1 mM)、*Cordyceps annulata* (SBHA-500 μ M) および *Gibellula formosana* (SBHA-1 mM + RG-108 1mM) において、特に顕著な変化が見られた (図 3)。

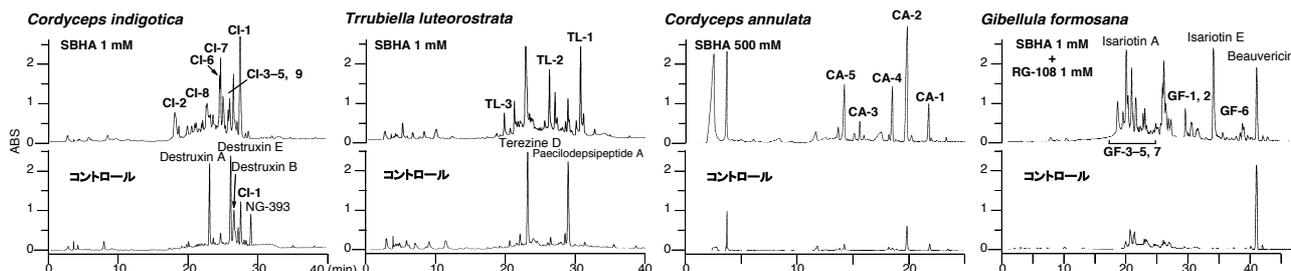


図3. 逆相HPLC分析による各培養条件における培地-酢酸エチル抽出物に含まれる二次代謝物の組成の比較

これら 4 種の菌について、図 3 に記した条件でそれぞれ大量培養し、培地-酢酸エチル抽出物より、阻害剤添加条件にて顕著に生産が向上した成分として、多種多様な新規化合物の取得に成功した (図 4)。

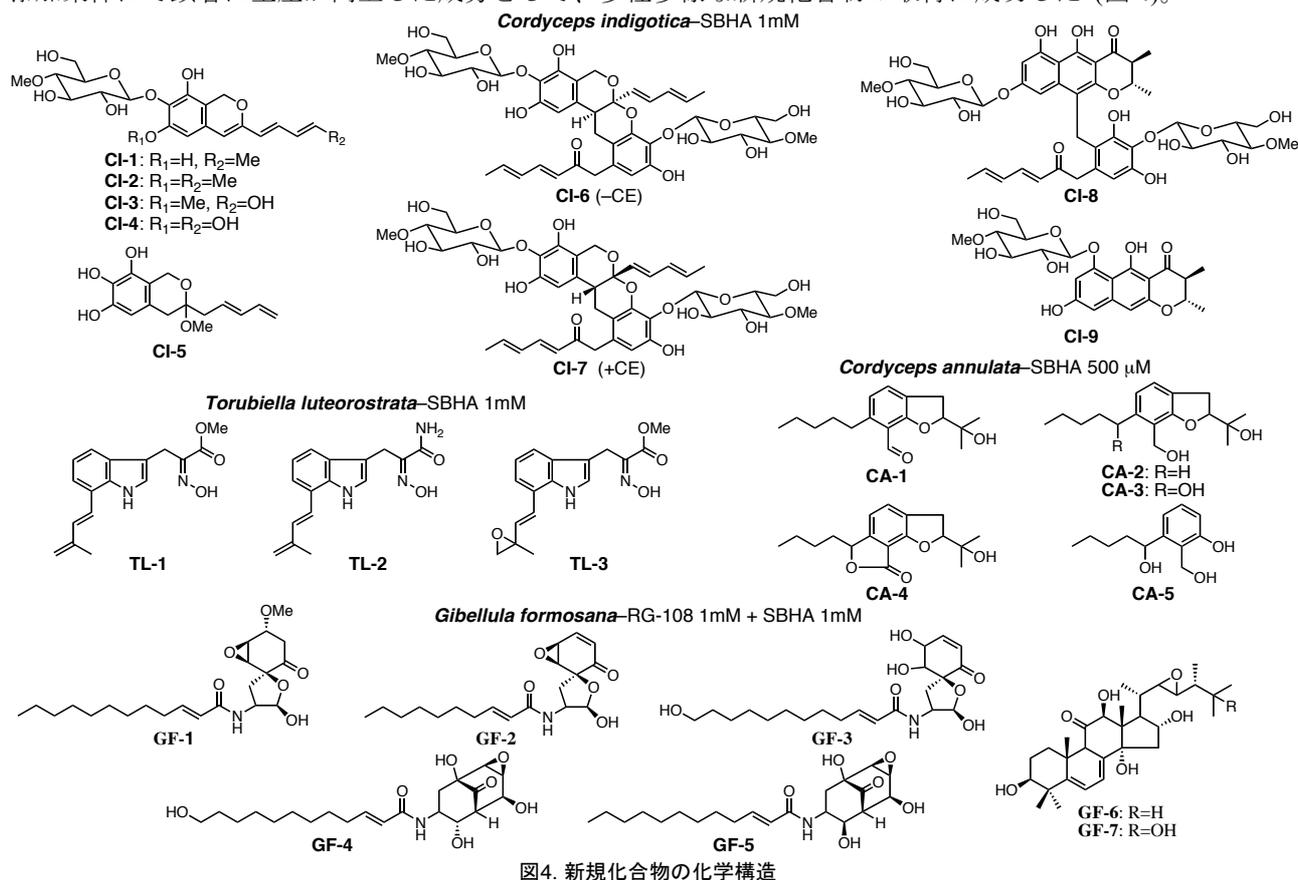


図4. 新規化合物の化学構造

現在、様々な糸状菌において、阻害剤添加により二次代謝物の生産性が活性化されることを見いだしており、今後、本手法を用いた物質探索を行うことで、より多くの新規二次代謝物の取得が期待される。

1) Palmer, J. M and Keller, N. P., *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 431-436.

2) Reys-Dominguez, *et al.*, Keller, N. P., Strauss, J., *Mol. Microbiol.* **2010**, *76*, 1376-1386.